

ПОДХОДЫ ПРИ ОЦЕНКЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРОДУКТОВ ЩЕЛОЧНОГО РАСТВОРЕНИЯ СЕРЫ

Витебский государственный медицинский университет

ВВЕДЕНИЕ

Для обеспечения высокого качества и надежности при испытании новых оригинальных потенциальных лекарственных средств по острой токсичности нами проведена сравнительная характеристика основных методик, используемых при расчете пробит-анализом.

Анализ литературных данных показал, что при испытании ветеринарных лекарственных средств наиболее часто используются методики расчета по Литчфилду-Уилкоксону, Миллера-Тейнтера с модификациями [2, 4]. Сравнение точности, а тем более параметры различия указанных методик не приводятся. Целью нашего исследования явилось провести сравнительную характеристику наиболее употребимых в ветеринарии математических алгоритмов, используемых при расчете параметров острой токсичности. Для достижения этой цели нами были поставлены следующие задачи:

1. определить параметры острой токсичности лекарственного средства Полисульфол по Литчфилду-Уилкоксону;
2. определить параметры острой токсичности лекарственного средства Полисульфол согласно [4];
3. определить параметры острой токсичности лекарственного средства Полисульфол согласно ГФ XI.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение острой токсичности проводили на беспородных белых мышках обоего пола. В качестве стабилизированных продуктов щелочного растворения серы использовался созданный нами новое лекарственное средство Полисульфол.

Животных разделили на 6 групп по 7 голов и содержали на обычном рационе. Поили и кормили животных не ранее, чем через 3-4 часа после дачи лекарственного средства. Полисульфол вводили внутрь в испытуемых дозах однократно. В контроле назначали воду. Наблюдение за животными вели в течение 14 дней после введения данного лекарственного средства. В ходе опыта учитывали внешний вид, поведение животных, состояние шерстного покрова, подвижность, отношение к корму, время возникновения и характер интоксикации, ее тяжесть, сроки выздоровления или гибели, количество павших животных и результаты патологоанатомического вскрытия павших животных.

Расчет и анализ параметров острой токсичности проводились в строгом соответствии с математическим алгоритмом, указанным в нормативных документах [1, 4] и монографии [1] с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2000» на персональном компьютере.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе опыта установлено, что при введении малых доз Полисульфола картина интоксикации характеризовалась кратковременным угнетением в течение 5 минут и снижением аппетита в течение суток. После назначения средних и больших доз у животных спустя 5-7 минут наблюдали резко выраженное возбуждение, проявлявшееся безудержным движением вперед; отмечалась повышенная возбудимость и реакция на внешние раздражители, западение глаз, саливация. В дальнейшем возбуждение сменялось угнетением, наблюдалась шаткая походка; животные падали, приобретали боковое положение и погибали в течение 2 - 3 часов

при явлениях судорог. У контрольных животных отклонений от нормы не зарегистрировано.

Картина патологоанатомического вскрытия павших животных характеризовалась застоем и отеком внутренних органов, незначительным гастроэнтеритом, анемичностью слизистых оболочек. При убое оставшихся животных после окончания опыта видимых изменений в паренхиматозных органах не зарегистрировано. Влияние Полисульфола на подопытных мышей представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние Полисульфола на подопытных мышей

Доза, мг/кг	Количество живых мышей	Количество погибших мышей	Гибель мышей, %
128,5	7	0	0,00
270,5	5	2	28,57
489,5	4	3	42,86
771,0	2	5	71,43
1082,1	1	6	85,71
1285,0	0	7	100,00

Расчет по Литчфилду-Уилкоксону осуществляли по математическому алгоритму описанному в монографии [1]. Автор доступно представил основные расчетные формулы. Часть из них была адаптирована в графических номограммах для облегчения техники расчета того времени. Нами была соблюдена точность и последовательность расчетов благодаря статистическим возможностям «Microsoft Excel 2000». Ручное построение графика на миллиметровой бумаге заменено регрессионным анализом с выводом основных параметров уравнения линейной регрессии и величины достоверной аппроксимации. Основные показатели, необходимые для расчета параметров острой токсичности по Литчфилду-Уилкоксону, представлены в таблице 2. График зависимости пробитов от логарифма вводимой дозы показан на рис.1.

Таблица 2

Показатели необходимые для расчета параметров острой токсичности по Литчфилду-Уилкоксону.

Доза (D) мг/кг	Наблюдаемая гибель		Ожидаемая гибель		lg D
	пробит	%	пробит	%	
128,5	2,93	1,9	3,42	5,7	2,11
270,5	4,43	28,6	4,31	24,4	2,43
489,5	4,82	42,9	5,03	51,0	2,69
771,0	5,57	71,4	5,57	71,6	2,89
1082,1	6,07	85,7	5,98	83,6	3,03
1285,0	6,79	96,3	6,19	88,2	3,11

Наиболее распространенной методикой расчета параметров острой токсичности лекарственных средств, используемых в ветеринарии, является математический алгоритм, описанный [4]. Методика расчета представляет собой комбинированный вариант расчета LD₅₀ по Першину Г.Н., сопряженный с нахождением размаха варьирования LD₅₀ по Миллеру-Тейнтеру и графическим интерфейсом пробит-анализа. Основные показатели, необходимые для расчета параметров острой токсичности по данной схеме представлены в таблице 3. График зависимости пробитов от логарифма вводимой дозы показан на рис. 2.

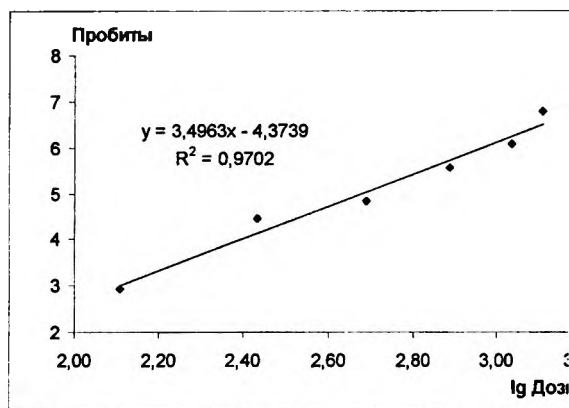


Рис. 1 График зависимости пробитов от логарифма вводимой дозы при однократном оральном введении по Литчфилду-Уилкоксону.

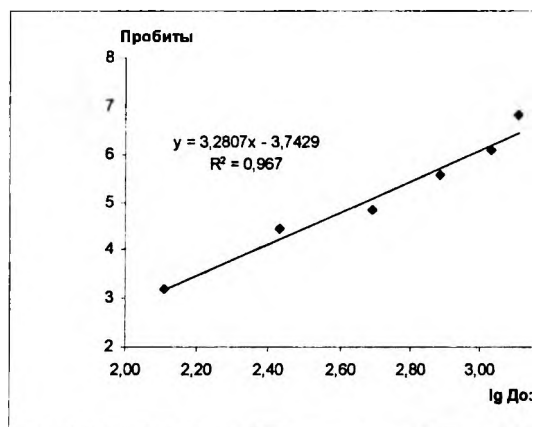


Рис. 2 График зависимости пробитов от логарифма вводимой дозы при однократном оральном введении согласно [4].

Таблица 3

Показатели, необходимые для расчета параметров острой токсичности согласно [4]

Доза (D) мг/кг	Наблюдаемая гибель		lg D	A+B	M-H	(A+B)*(M-H)
	пробит	%				
128,5	3,2	0,0	2,11	399,03	28,57	11400,75
270,5	4,43	28,6	2,43	760,05	14,29	10857,86
489,5	4,82	42,9	2,69	1260,52	28,57	36014,97
771,0	5,57	71,4	2,89	1853,11	14,29	26472,93
1082,1	6,07	85,7	3,03	2367,11	14,29	33815,79
1285,0	6,8	100,0	3,11	Сумма		118562,30

Для испытания зарегистрированных лекарственных средств пользуются методикой расчета параметров альтернативных фармакологических реакций, описанной в Государственной Фармакопее СССР XI (ГФ XI). Математический алгоритм имеет разветвленную структуру и лишен графического интерфейса.

Показатели необходимые для расчета параметров острой токсичности согласно ГФ XI, приведены в таблице 4 и таблице 5.

Таблица 4

Первичные показатели, необходимые для расчета параметров острой токсичности по ГФ XI

Дозы	lgD	y	w	nw	nwx	nwy	nwx ²	nwxу
270,5	2,432	4,44	0,5660	3,962	9,636	17,58	92,86	169,41
489,5	2,690	4,82	0,6287	4,401	11,838	21,20	140,13	250,96
771,0	2,887	5,56	0,5660	3,962	11,439	22,04	130,84	252,11
1082,1	3,034	6,07	0,4153	2,907	8,820	17,64	77,80	155,61
Суммы			2,1760	15,2320	41,73	78,46	441,63	828,081

Таблица 5

Вторичные показатели необходимые для расчета параметров острой токсичности по ГФ XI.

V	x	y	SQ	SP	B	B	g
0,06566	2,7398	5,1511	327,292	613,110	0,00306	1,8733	0,00335

В таблице 6 представлены параметры острой токсичности рассчитанные графическим методиками пробит-анализа. LD₅₀ (доза, вызвавшая гибель 50% животных) LD₁₆ (доза, вызвавшая гибель 16% животных), LD₈₄ (доза, вызвавшая гибель 84% животных), N' (количество животных, получавших дозу больше LD₁₆ и меньше LD₈₄), S – стандартная ошибка, f_{LD50} – коэффициент размаха варьирования LD₅₀, S_{LD50} – размах варьирования LD₅₀.

Таблица 6

Параметры острой токсичности, рассчитанные тремя методиками.

Согласно [4]								
Интервал LD ₅₀		N'	LD ₅₀	LD ₁₆	LD ₈₄	S	f _{LD50}	S _{LD50}
498,8	686,8	28	592,8	229,2	932,8	2,08	1,19	94,03
Согласно Литчфилду-Уилкоксону								
Интервал LD ₅₀		N'	LD ₅₀	LD ₁₆	LD ₈₄	S	f _{LD50}	S _{LD50}
339,9	677,4	28	479,9	248,4	927,1	1,93	1,41	231,5
Согласно ГФ XI								
Интервал LD ₅₀		N'	LD ₅₀	LD ₁₆	LD ₈₄	S	f _{LD50}	S _{LD50}
245,7	846,2	28	456,2				1,86	210,5

Проводя сравнительный анализ, установлено, что максимальное значение LD₅₀ принимает при расчете согласно [4]. Разрабатывая комбинированный математический алгоритм расчета параметров острой токсичности, авторы методических указаний, возможно, стремились завязать значение LD₅₀. Это необходимо для более тщательного подхода при назначении терапевтической дозы для новых лекарственных средств. Расчет диапазона варьирования LD₅₀ проводили по одному из вариантов пробит-анализа – методу Миллера-Тейнтера. Эта разновидность пробит-анализа отличается простотой исполнения и быстротой обработки результатов эксперимента. Однако метод Миллера-Тейнтера по информативности далеко не исчерпывает все возможности пробит-анализа и в отдельных случаях не полностью объективен. Так, вычисление значений «рабочих» пробитов для доз, которые в опыте оказались не эффективными или вызвали эффект у всей группы животных осуществляется только в зависимости от числа животных в группе, без учета расположения других точек на графике. Кроме того, оценка параллельности прямых, в результате которой выясняется возможность сопоставления фармакологической активности изучаемых веществ, производится без использования какого-либо объективного критерия. Метод Миллера-Тейнтера не дает возможности вычислить доверительные границы относительных активностей, что затрудняет сравнительную количественную оценку изучаемых веществ.

Математический алгоритм, описанный в ГФ XI, можно отнести к пробит-анализу лишь по использованию ключевой таблицы пробитов, соответствующих процентам положительных ответов. Как было уже указано выше, метод лишен графического интерфейса, а для коррекции получаемых первичных показателей введены весовые коэффициенты. Разработчики данной методики руководствовались тем, что в государственную фармакопею включаются лекарственные средства, которые давно уже применяются в медицине и ветеринарии, и испытание их на острую токсичность несет лишь дополнительную информацию о качестве лекарственного средства. Этим также можно объяснить допустимость использования данной методикой двух испытуемых доз (обычно пробит-анализ требует для испытания не менее

трех доз). Кроме того, этой методикой невозможно определить LD_{16} и LD_{84} . LD_{50} , рассчитанное по этому алгоритму, имеет самое низкое значение, а интервал LD_{50} сопоставим с методом Литчфилда-Уилкоксона.

Наиболее полную и объективную информацию о величине фармакологической активности изучаемых соединений дает применение метода, предложенного Литчфилдом и Уилкоксоном. Метод лишен всех вышеперечисленных недостатков и имеет мощный математический алгоритм, позволяющий разрешение достаточно сложных проблем в фармакологии. Однако использование его в прошлом ограничивалось из-за сложности расчетных операций, отсутствия доступной вычислительной техники и соответствующего программного обеспечения. В настоящее время статистические возможности таких программ как «Microsoft Excel 2000» позволяют автоматизировать алгоритм метода Литчфилда-Уилкоксона и более точно определять параметры острой токсичности для лекарственных средств.

Проведенными исследованиями установлено, что параметры острой токсичности «Полисульфола», рассчитанной методом Литчфилда-Уилкоксона при внутреннем введении составили: LD_{16} – 248,4 мг/кг, а LD_{84} – 927,1 мг/кг, а LD_{50} составила – 479,9 мг/кг.

ВЫВОДЫ

1. При разработке новых лекарственных средств для вычисления параметров острой токсичности наиболее оптимальным является метод Литчфилда-Уилкоксона.
2. Полисульфол относится к малотоксичным лекарственным средствам, а активные продукты щелочного растворения серы – к умеренно токсичным соединениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л., «Госметиздат», 1963. – 151 с.
2. Государственная фармакопея СССР. XI издание. - М., 1987. – С. 221-252.
3. Каган Ю.С. Количественный анализ опасности и гигиеническая классификация пестицидов // Профилактическая токсикология. М., 1984. – С. 123-124.
4. Методические указания по токсикологической оценке новых препаратов для лечения и профилактики незаразных болезней животных // Воронеж, 1987. 22 с.

SUMMARY

Ya. V. Polevko, I. S. Veremey

APPROACHES TO DETERMINATION OF ACUTE TOXICITY OF SULPHUR ALKALINE DILUTION PRODUCTS

In this article the pharmacological characteristics of design procedures of parameters of an acute toxicity according to methodical indications, method Litchfield-Wilcoxon, State Pharmacopoeia of USSR XI is considered by the example of drug «Polysulfol». The obtained data allow to judge, that by development of new medicinal preparations for calculation of parameters of an acute toxicity by the optimal method Litchfield-Wilcoxon is. Under the table of classification of chemicals, at single-pass oral introduction, «Polysulfol» falls into hypotoxicity drugs.
